

HEAT REVERSIBLE HYDROGEL-FORMING COMPOSITION

Publication number: JP2005060570

Publication date: 2005-03-10

Inventor: YOSHIOKA HIROSHI; MORI YUICHI; MIURA SHIGEKI;
HISHIKAWA KEIICHI

Applicant: MEBIOL KK; MORI YUICHI

Classification:

- international: **A61L15/44; A61L26/00; C08G81/00; C08L101/14;**
A61L15/16; A61L26/00; C08G81/00; C08L101/00;
(IPC1-7): C08L101/14; A61L15/44; A61L26/00;
C08G81/00

- european:

Application number: JP20030293528 20030814

Priority number(s): JP20030293528 20030814

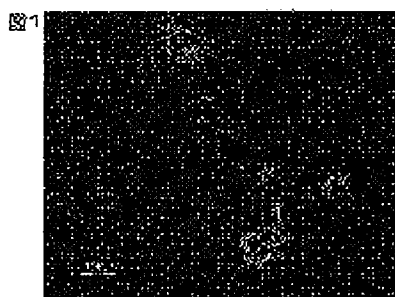
[Report a data error here](#)

Abstract of JP2005060570

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a heat reversible hydrogel-forming composition, capable of increasing degree of freedom of design between a gel state and a non-gel state.

SOLUTION: The heat reversible hydrogel-forming composition has heat reversible sol-gel transition temperature (T_{a} [deg.]C) of the aqueous solution and comprises at least (A) a hydrogen-forming polymer which becomes a sol state on lower temperature side and becomes a gel state on higher temperature side than the sol-gel transition temperature and (B) a polymer in which the aqueous solution has a clouding point (T_{b} [deg.]C). The aqueous solution or the dispersion of the heat reversible hydrogel-forming composition becomes substantially water-insoluble hydrogel state at a temperature higher than a higher temperature (T_{H}) in T_{a} and T_{b} and exhibits reversibly water-soluble property at a temperature lower than a lower temperature in T_{a} and T_{b} .

COPYRIGHT: (C)2005,JPO&NCIP



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-60570

(P2005-60570A)

(43) 公開日 平成17年3月10日(2005.3.10)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C08L 101/14	C08L 101/14	4C081
A61L 15/44	C08G 81/00	4J002
A61L 26/00	A61L 15/03	4J031
C08G 81/00	A61L 25/00	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2003-293528 (P2003-293528)	(71) 出願人	596009814
(22) 出願日	平成15年8月14日 (2003.8.14)		メビオール株式会社
			東京都新宿区余丁町14番地4号
		(71) 出願人	395024506
			森 有一
			神奈川県横浜市金沢区釜利谷南3-21-2-4
		(74) 代理人	100099759
			弁理士 青木 篤
		(74) 代理人	100077517
			弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
		(74) 代理人	100089901
			弁理士 吉井 一男

最終頁に続く

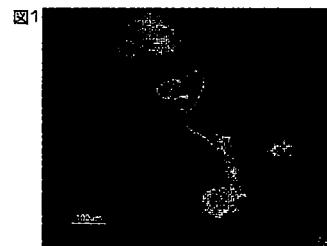
(54) 【発明の名称】 熱可逆ハイドロゲル形成性組成物

(57) 【要約】

【課題】 ゲル状態-非ゲル状態間の設計の自由度を増大させることが可能な熱可逆ハイドロゲル形成性組成物を提供する。

【解決手段】 その水溶液が熱可逆的ゾル-ゲル転移温度 (T_g , °C) を有し、該ゾル-ゲル転移温度より低温側でゾル状態、高温側でゲル状態となるハイドロゲル形成性の高分子 (A) と、その水溶液が曇点 (T_b , °C) を有する高分子 (B) を少なくとも含む熱可逆ハイドロゲル形成性組成物。該熱可逆ハイドロゲル形成性組成物の水溶液または分散液は、 T_g および T_b のうち高い方の温度 (T_H) より高い温度で実質的に水不溶性のハイドロゲル状態となり、且つ、 T_g および T_b のうち低い方の温度 (T_L) より低い温度で可逆的に水可溶性を示す。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

その水溶液が熱可逆的ゾルーゲル転移温度 (T_g , °C) を有し、該ゾルーゲル転移温度より低温側でゾル状態、高温側でゲル状態となるハイドロゲル形成性の高分子 (A) と、その水溶液が曇点 (T_b , °C) を有する高分子 (B) を少なくとも含む熱可逆ハイドロゲル形成性組成物であって;

該熱可逆ハイドロゲル形成性組成物の水溶液または分散液が、 T_g および T_b のうち高い方の温度 (T_H) より高い温度で実質的に水不溶性のハイドロゲル状態となり、且つ、 T_g および T_b のうち低い方の温度 (T_L) より低い温度で可逆的に水可溶性を示す熱可逆ハイドロゲル形成性組成物。

10

【請求項 2】

前記高分子 (A) の熱可逆的ゾルーゲル転移温度 (T_g , °C) が 5 °C 以上 45 °C 以下である請求項 1 に記載の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物。

【請求項 3】

前記高分子 (B) の曇点 (T_b , °C) が 5 °C 以上 45 °C 以下である請求項 1 または 2 に記載の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物。

【請求項 4】

前記高分子 (A) または (B) の少なくとも一方が生理活性物質を結合したものであることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物。

【請求項 5】

前記高分子 (B) が生理活性物質を結合したものである請求項 4 に記載の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物。

20

【請求項 6】

前記生理活性物質が細胞接着因子である請求項 4 または 5 に記載の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、温度変化に対応してハイドロゲル状態と水溶液状態 (ゾル) とが可逆的に変化する熱可逆 (性) ハイドロゲル形成性組成物に関する。より詳しくは、本発明は、ゾルーゲル転移温度より低温側でゾル状態となり、該転移温度の高温側でゲル状態となるような「昇温時ゲル化タイプ」の特性を有する熱可逆ハイドロゲル形成性組成物に関する。

30

【0002】

本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物は、その昇温時ゲル化タイプの特性を活かして広い範囲に特に制限なく適用可能であり、例えば、細胞 (組織) 培養担体、創傷被覆材、生体接着剤等に好適に利用可能である。本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物は、更に種々の生理活性物質の包含により、生理活性をも示すことが可能である。

【背景技術】

【0003】

従来より、熱可逆性を示すハイドロゲルとしては、寒天やゼラチンのゲルが周知である。寒天やゼラチンの水溶液は、冷却により流動性を失ってゼリー状のハイドロゲルとなり、加熱によって再び水溶液に戻るタイプ、すなわち、降温時ゲル化タイプの熱可逆ゾルーゲル転移を示す。

40

【0004】

これらのハイドロゲルとは逆に、加熱によってハイドロゲルとなる昇温時ゲル化タイプの性質を示すものとしては、多糖類誘導体であるメチルセルロースの水溶液が知られている。しかしながら、メチルセルロース水溶液は 45 °C 以上の高温でしかゲルとならないため、実用上の利用価値が殆どなく、従来より、このような昇温時ゲル化タイプの特性は殆ど活用されていない。

【0005】

50

一方、非イオン性界面活性剤の中にも、その水溶液が昇温時ゲル化タイプの熱可逆ゾル-ゲル転移を示すものがある。例えば、ポリプロピレンオキサイドの両端にポリエチレンオキサイドが結合されてなるプルロニック F-127 (商品名、BASF Wyandotte Chemicals Co. 製) の高濃度水溶液は、約 20℃ 以上でハイドロゲルとなり、それより低い温度で水溶液となることが知られている (例えば、B. Chu, Langmuir, 11, 414-421 (1995) ; 非特許文献 1 を参照。) 。

【0006】

しかしながら、この材料 (プルロニック F-127) の場合、約 20 質量% (重量%) 以上の高濃度でしかハイドロゲルを形成せず、したがって生成したハイドロゲル中の含水率が低いという問題があった。

10

【0007】

また、この材料を用いた場合、約 20 質量% 以上の高濃度でゲル化させ、ゲル化温度より高い温度に保持した場合であっても、該ゲルに更に水を加えるとゲルが溶解してしまう (すなわち、一旦生成したハイドロゲルが水溶性である) という問題があった。このような現象は、例えば、該ゲルを創傷被覆材として使用した場合には、創傷面から分泌される滲出液によって、該ハイドロゲルが創傷面中に溶解・消失してしまうという重大な欠点につながる。

【0008】

更に従来の熱可逆ハイドロゲルは、ハイドロゲル状態で均一な相を形成しているために複雑な機能を発現することが困難となる場合があり、例えば細胞 (組織) 培養担体、創傷被覆材、生体接着剤等に利用しようとする際、十分な機能が発揮されない場合があった。

20

【0009】

【非特許文献 1】 B. Chu, Langmuir, 11, 414-421 (1995)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の目的は、上記した従来の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物の欠点を解消した熱可逆ハイドロゲル形成性組成物を提供することにある。

【0011】

本発明の他の目的は、ゲル状態-非ゲル状態間の設計の自由度を増大させることが可能な熱可逆ハイドロゲル形成性組成物を提供することにある。

30

【0012】

本発明の更に他の目的は、ゲル中に生理活性物質を良好に保持し、更に該生理活性物質の機能を良好に発現し得る熱可逆ハイドロゲル形成性組成物を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者らは鋭意研究の結果、熱可逆ハイドロゲル形成性高分子 (A) と曇点を有する高分子 (B) との少なくとも 2 種類の高分子を含む組成物に基づくハイドロゲルが、これらの 2 種類の高分子の共存に基づき、従来の熱可逆ハイドロゲルでは困難であった複雑な機能 (例えば、ゲルと非ゲルとが共存した状態) を発現できることを見出した。

40

【0014】

更に該ハイドロゲル中に生理活性物質を好適に保持可能であるのみならず、該ゲル中において該生理活性物質本来の機能を良好に発現できることを見出し、本発明を完成した。

【0015】

本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物は上記知見に基づくものであり、より詳しくは、その水溶液が熱可逆的ゾル-ゲル転移温度 (T_g ℃) を有し、該ゾル-ゲル転移温度より低温側でゾル状態、高温側でゲル状態となるハイドロゲル形成性の高分子 (A) と、その水溶液が曇点 (T_b ℃) を有する高分子 (B) を少なくとも含む熱可逆ハイドロゲル形成性組成物であって、該熱可逆ハイドロゲル形成性組成物の水溶液または分散液が、 T_g および T_b のうち高い方の温度 (T_H) より高い温度で実質的に水不溶性のハイドロゲ

50

ル状態となり、且つ、 T_a および T_b のうち低い方の温度 (T_L) より低い温度で可逆的に水可溶性を示すものである。

【0016】

本発明によれば、更に、上記高分子 (A) または (B) の少なくとも一方が生理活性物質を結合した熱可逆ハイドロゲル形成性組成物が提供される。

【0017】

本発明者らの知見によれば、上記構成を有する本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物は、ハイドロゲル状態においてハイドロゲル形成性の高分子と曇点を有する高分子とが相分離構造を有するため、複雑な機能を発現できると推定される。例えば、本発明においては、ゲル状態－非ゲル状態間に、中間的な状態（例えば、ゲルと非ゲルとが共存した状態）を発現することができ、ゲル状態－非ゲル状態制御の自由度を増大させることができる。

【0018】

更に、ゲル内に生理活性物質を固定化することにより、ゲル中に生理活性物質自体を好適に保持可能であるのみならず、該ゲル中において該生理活性物質本来の機能を良好に発現できるため、種々の用途に広く利用することが可能となる。

【0019】

本発明者らは既に、ゾルーゲル転移温度が 5°C 以上 40°C 以下であり、該転移温度より低い温度でゾル、該転移温度より高い温度の温度でゲルとなり、該ゲルが実質的に水不溶性であることを特徴とする昇温時ゲル化タイプの熱可逆ハイドロゲル形成性組成物を開発してきた（特開平5-262882）。上記熱可逆ハイドロゲル形成性組成物中に低分子量の生理活性物質を含有させ、上記ハイドロゲルに種々の生理活性を付与させることも提案されている（特願平8-29572、WO 95/15152）。

【0020】

上記した先願の昇温時ゲル化タイプ熱可逆ハイドロゲル形成性組成物のゾルーゲル転移温度を室温付近に設定すれば、室温以下でゾル、細胞培養温度や体温 (37°C) でハイドロゲルとなるため、室温液状で細胞を取り込み、 37°C に昇温してゲル化させ、細胞をゲル内で3次元的に培養できる細胞（組織）培養担体（特開平6-141851）や、室温液状で創面上に塗布し、体温 (37°C) でゲル化させ、創面を保護することのできる創傷被覆材（WO 95/07719）等が提供される。

【0021】

更に本発明者らは、その水溶液が 5°C 以上 45°C 以下の熱可逆的ゾルーゲル転移温度を有し、該ゾルーゲル転移温度より低温側でゾル状態、高温側でゲル状態となることを特徴とするハイドロゲル形成性の高分子と生理活性物質から成る熱可逆性ハイドロゲル形成性組成物に関する特許（特開平11-169703）を出願している。

【0022】

他方、本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物は、更にその水溶液が曇点（好ましくは 5°C 以上 45°C 以下）を有する高分子をも含有するため、ハイドロゲル状態において好適な相分離構造を形成することができ、種々の優れた特性を発揮することができる（本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物は、例えば、細胞接着性等の生体に対する親和性において、従来のハイドロゲルより優れた特性を有する）。

【発明の効果】

【0023】

本発明によれば、その水溶液が熱可逆的ゾルーゲル転移温度 (T_g 、 $^{\circ}\text{C}$) を有し、該ゾルーゲル転移温度より低温側でゾル状態、高温側でゲル状態となるハイドロゲル形成性の高分子 (A) と、その水溶液が曇点 (T_c 、 $^{\circ}\text{C}$) を有する高分子 (B) を少なくとも含む熱可逆ハイドロゲル形成性組成物であって；該熱可逆ハイドロゲル形成性組成物の水溶液または分散液が、 T_a および T_b のうち高い方の温度 (T_H) より高い温度で実質的に水不溶性のハイドロゲル状態となり、且つ、 T_a および T_b のうち低い方の温度 (T_L) より低い温度で可逆的に水可溶性を示す熱可逆ハイドロゲル形成性組成物が提供される。

【0024】

本発明によれば、更に上記高分子（A）または（B）の少なくとも一方が生理活性物質を結合した熱可逆ハイドロゲル形成性組成物が提供される。

【0025】

上記構成を有する本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物は、ハイドロゲル状態においてハイドロゲル形成性の高分子と曇点を有する高分子とが相分離構造を形成するため、複雑な機能（例えば、ゲルと非ゲルとが共存した状態）を発現することができる。更に、ゲル内に生理活性物質を固定化することにより、ゲル中に生理活性物質自体を好適に保持可能であるのみならず、該ゲル中において該生理活性物質本来の機能を良好に発現できるため、種々の用途に広く利用することが可能となる。

10

【0026】

本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物を用いれば、従来の昇温時ゲル化タイプ熱可逆ハイドロゲル形成性組成物に種々の機能（例えば、分離機能、薬剤徐放機能、光学的（例えば分光、散乱）機能、生理活性機能）を付加することが可能となる。これらの諸機能のうち、生理活性機能としては、例えば、生体適合性、細胞接着性、細胞増殖能促進、細胞分化能促進等の機能を付加することが可能となる。したがって、これらの生理活性機能を利用する用途、例えば、細胞（組織）培養器材、創傷被覆材、生体接着剤、DDS用基材、塞栓剤、関節易滑剤等として、特に制限なく利用することが可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0027】

以下、必要に応じて図面を参照しつつ本発明を更に具体的に説明する。以下の記載において量比を表す「部」および「%」は、特に断らない限り質量基準（すなわち、質量%および質量部）とする。

20

（ハイドロゲル形成性の高分子（A））

本発明に使用可能な「ハイドロゲル形成性の高分子」は、その水溶液または水分散液が特定の温度（ゾル-ゲル転移温度； T_g ℃）より高い温度でハイドロゲルとなり、且つ、該温度より低い温度ではゾルないし液状となる特性を有する。生体や細胞を対象とした利用が容易な点からは、このゾル-ゲル転移温度は5℃以上、45℃以下（更には10～37℃）の温度領域中にあることが好ましい。

（ゾル-ゲル転移温度）

30

本発明において、試料のゾル-ゲル転移温度は、文献（H. Yoshiokaら、Journal of Macromolecular Science, A31（1），113（1994））に記載された方法に従って測定することができる。

【0028】

即ち、観測周波数1Hzにおける試料の動的弾性率を徐々に温度を変化（低温側から高温側へ、または高温側から低温側へ1℃/1分）させて測定し、該試料の貯蔵弾性率（ G' 、弾性項）と損失弾性率（ G'' 、粘性項）が交差する点の温度をゾル-ゲル転移温度とする。一般に、 $G'' > G'$ の状態がゾル、 $G'' < G'$ の状態がゲルと定義される。昇温時と降温時でゾル-ゲル転移温度が（例えば、絶対値で2℃以上）異なる場合には、その中間の温度をゾル-ゲル転移温度とする。このゾル-ゲル転移温度の測定に際しては、下記の測定条件が好適に使用可能である。

40

<動的弾性率の測定条件>

測定機器：商品名＝ストレス制御式レオメーターAR500、TAインスツルメンツ社製、

試料溶液（ないし分散液）の濃度（ただし「熱可逆ハイドロゲル形成性組成物」の濃度として）：10（重量）%、

試料溶液の量：約0.8 g

測定用セルの形状・寸法：アクリル製平行円盤（直径4.0cm）、ギャップ600μm。

【0029】

50

適用ストレス：線形領域内。観測周波数：1 Hz。

(曇点を有する高分子 (B))

曇点とは、透明な高分子の水溶液（濃度1質量%）を徐々に（例えば、1℃/分程度で）加熱した際に、はじめて白濁を生じる温度を言う。本発明においては、この曇点が5℃～45℃であることが望ましい。すなわち、その水溶液が曇点を有する高分子は曇点より低い温度では水に溶解するが、曇点より高い温度では非水溶性となり水相と高分子相に巨視的に相分離し水溶液から析出する。この曇点の測定に際しては、下記の測定条件が好適に使用可能である。

【0030】

＜曇点の測定条件＞

測定機器：商品名＝温度コントローラー（SPR-10、(株)日立製作所）付き分光光度計（U-3210、(株)日立製作所）および熱電対温度計（TX-10、横河M&C(株)）、

試料溶液（水溶液）の濃度（ただし「その水溶液が曇点を有する高分子」の濃度として）：1（重量）%、

試料溶液の量：約3.5 g、

測定用セルの形状・寸法：ガラス製セル1cm×1cm。

【0031】

測定波長500nm。

【0032】

水溶液の昇温速度：1℃/分。

【0033】

操作：水溶液と攪拌子を入れたセルをセルホルダにセットして攪拌しながら、曇点より5℃以上低い温度から昇温する。500nmにおける光透過度と水溶液の温度を連続的に測定し、光透過度が急激に低下し始めた温度を曇点とする。光透過度が急激に低下する目安は、1℃の温度上昇で光透過度が3%以上低下する（3%/℃）ことである。

【0034】

その水溶液が曇点を有する高分子 (B) としては、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド、ポリ-N-n-プロピルアクリルアミド、ポリ-N-シクロプロピルアクリルアミド、ポリ-N,N-ジエチルアクリルアミド、ポリ-N-アクリロイルピペリジン、ポリ-N-アクリロイルピロリジン、ポリ-N,N-エチルメチルアクリルアミド等のポリN置換アクリルアミド誘導体、ポリ-N-イソプロピルメタアクリルアミド、ポリ-N-シクロプロピルメタアクリルアミド等のポリN置換メタアクリルアミド誘導体、ポリプロピレンオキサイド等のポリアルキレンオキサイド、ポリビニルメチルエーテル、ポリビニルアルコール部分酢化物等が挙げられる。

【0035】

上記の高分子化合物は単独でも、他の単量体と共重合（例えばランダム共重合）させて得たものでも良い。共重合する単量体としては、親水性単量体、疎水性単量体のいずれも用いることができる。一般的にポリN置換（メタ）アクリルアミド誘導体の曇点は親水性単量体と共重合すると上昇し、疎水性単量体と共重合すると下降する。従って、これらを選択することによっても、所望の曇点を有する高分子を得ることができる。

(親水性単量体)

親水性単量体としては、N-ビニルピロリドン、ビニルピリジン、アクリルアミド、メタアクリルアミド、N-メチルアクリルアミド、ヒドロキシエチルメタアクリレート、ヒドロキシエチルアクリレート、ヒドロキシメチルメタアクリレート、ヒドロキシメチルアクリレート、酸性基を有するアクリル酸、メタアクリル酸およびそれらの塩、ビニルスルホン酸、スチレンスルホン酸等、並びに塩基性基を有するN,N-ジメチルアミノエチルメタアクリレート、N,N-ジエチルアミノエチルメタアクリレート、N,N-ジメチルアミノプロピルアクリルアミドおよびそれらの塩等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

10

20

30

40

50

(疎水性単量体)

一方、疎水性単量体としては、エチルアクリレート、メチルメタクリレート、*n*-ブチルメタクリレート、グリシジルメタクリレート等のアクリレート誘導体およびメタクリレート誘導体、*N*-*n*-ブチルメタアクリルアミド等の*N*置換アルキルメタアクリルアミド誘導体、塩化ビニル、アクリロニトリル、スチレン、酢酸ビニル等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

(ハイドロゲル形成性の高分子 (A) を構成する共重合体)

本発明に使用可能なハイドロゲル形成性の高分子 (A) は、上記の特性を有するものであれば特に制限はない。本発明においては、ゾル-ゲル転移温度を分子設計により任意に設定可能な点からは、その水溶液が曇点を有する高分子ブロック (C) と親水性高分子ブロック (D) を結合してなる共重合体であって、且つ、分子量 10 万以上 (更には 10 万以上) のものが好ましく用いられる。

10

【0036】

ここに分子量 10 万以上の共重合体とは、上記の曇点より低い (例えば、絶対値で 2℃ 以上低い) 温度において、その水溶液を分画分子量 10 万の限外濾過膜 (例えば、アミコン社製 YM100) を用いて限外濾過した際に、実質的に濾過されないものをいう。より具体的には、下記の条件下で分画分子量 10 万の限外濾過膜を用いて、蒸留水中で限外濾過した場合に、濾液に検出される高分子が高分子全体の 10% 以下 (更には 5% 以下) であることを言う。

【0037】

20

<限外濾過方法>

ハイドロゲル形成性の高分子をそのゾル-ゲル転移温度より低い温度 (好ましくは、絶対値で 2℃ 以上低い温度) で蒸留水に濃度 0.5 質量% で溶解し、分画分子量 10 万の限外濾過膜 (アミコン社製 YM100) を用いて 1 kg/cm^2 の加圧下で濾過原液の量が 1/2 になるまで限外濾過し、濾液 (約 100 mL) を採取する。本発明において高分子が「実質的に濾過されない」とは、該濾液中の高分子濃度を定量した際に、その濃度が 0.05 質量% 以下 (更には 0.025 質量% 以下) であることを言う。

【0038】

ここに、濾液中の高分子濃度は、例えば 100 g の濾液を凍結乾燥して、残存物の重量を測定することにより求めることができる。

30

(曇点を有する高分子ブロック (C))

その水溶液が曇点を有する高分子ブロック (C) としては、上述したような、その水溶液が曇点を有する高分子 (B) と同様の高分子化合物を用いることができる。例えば、ポリ-*N*-イソプロピルアクリルアミド、ポリ-*N*-*n*-プロピルアクリルアミド、ポリ-*N*-シクロプロピルアクリルアミド、ポリ-*N*, *N*-ジエチルアクリルアミド、ポリ-*N*-アクリロイルピペリジン、ポリ-*N*-アクリロイルピロリジン、ポリ-*N*, *N*-エチルメチルアクリルアミド等のポリ*N*置換アクリルアミド誘導体、ポリ-*N*-イソプロピルメタアクリルアミド、ポリ-*N*-シクロプロピルメタアクリルアミド等のポリ*N*置換メタアクリルアミド誘導体、ポリプロピレンオキサイド等のポリアルキレンオキサイド、ポリビニルメチルエーテル、ポリビニルアルコール部分酢化物等が挙げられる。

40

【0039】

上記の高分子化合物は単独でも、他の単量体と共重合 (**例えばランダム共重合**) させて得たものでも良い。共重合する単量体としては、親水性単量体、疎水性単量体のいずれも用いることができる。一般的にポリ*N*置換 (メタ) アクリルアミド誘導体の曇点は親水性単量体と共重合すると上昇し、疎水性単量体と共重合すると下降する。従って、これらを選択することによっても、所望の曇点を有する高分子を得ることができる。ここで用いる親水性単量体、疎水性単量体も上述したその水溶液が曇点を有する高分子 (B) の場合と同様である。

(親水性高分子ブロック (D))

本発明における親水性高分子ブロック (D) としては、例えば、メチルセルロース、デ

50

キストラン、ポリエチレンオキサイド、ポリビニルアルコール、ポリN-ビニルピロリドン、ポリビニルピリジン、ポリアクリルアミド、ポリメタアクリルアミド、ポリN-メチルアクリルアミド、ポリヒドロキシメチルアクリレート、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリビニルスルホン酸、ポリスチレンスルホン酸およびそれらの塩、ポリN, N-ジメチルアミノエチルメタクリレート、ポリN, N-ジエチルアミノエチルメタクリレート、ポリN, N-ジメチルアミノプロピルアクリルアミドおよびそれらの塩等が挙げられる。更に種々の水溶性の生体高分子も本発明における親水性高分子として使用可能である。このような水溶性の生体高分子としては、例えば、ゼラチン、アルブミン、グロブリン、フィブリノーゲン、インスリン、グルカゴン等のタンパク質やペプチド類、デンプン、アガロース、グリコーゲン、ヒアルロン酸、ヘパリン等の多糖類、RNA、DNA等の核酸類が挙げられる。

10

(ハイドロゲル形成性高分子(A)の熱可逆ゾルーゲル転移のメカニズム)

本発明のハイドロゲル形成性の高分子(A)の水溶液は、ゾルーゲル転移温度の低温側では流動性のある水溶液であり、ゾルーゲル転移温度の高温側では流動性を失ってハイドロゲルとなる、昇温時ゲル化タイプの熱可逆ゾルーゲル転移を示す。

【0040】

本発明者の知見によれば、このような昇温時ゲル化のメカニズムは以下のように推定される。

【0041】

すなわち、共重合体(A)中の曇点を有する高分子ブロック部分の曇点より低い温度では、該曇点を有する高分子部分、親水性高分子ブロック部分ともに水溶性であるため、該共重合体は完全に水に溶解する。しかしながら、この水溶液の温度を該曇点より高い温度に昇温すると、該曇点を有する高分子ブロック部分が非水溶性となって凝集し分子間会合が起こる。一方、親水性高分子ブロック部分は曇点より高い温度においても水溶性を保つため、該曇点を有する高分子ブロック部分間の凝集が巨視的な相分離に至ることを防止し、これに基づき安定なハイドロゲルが形成される。

20

(曇点を有する高分子ブロック(C)の含有量)

本発明に用いられるハイドロゲル形成性の高分子(A)における、その水溶液が曇点を有する高分子ブロック(C)と親水性高分子ブロック(D)を結合してなる共重合体中の(C)の含有量は、(ブロック(C)とブロック(D)との合計質量を基準として)10~90質量%(更には、30~70質量%)の範囲であることが好ましい。曇点を有する高分子ブロック(C)の含有量が10質量%未満の場合、該曇点を有する高分子部分間の凝集力が不十分なために、該曇点より高い温度でもハイドロゲルとなり難い傾向が強まる。他方、高分子ブロック(C)の含有量が90質量%を上回る場合は、曇点を有する高分子部分間の凝集力が強すぎて、系全体が巨視的な相分離(著しいゲルのシネレシス)を起こし易くなり、安定なハイドロゲルが得られ難くなる傾向が強まる。

30

(共重合体の結合様式)

本発明に使用可能なハイドロゲル形成性の高分子(A)における、その水溶液が曇点を有する高分子(C)と親水性高分子(D)を結合してなる共重合体の結合様式は、特に制限されない。該結合様式としては、例えば、AとBのブロック共重合体、あるいは主鎖Aに側鎖Bが結合したグラフト共重合体、または主鎖Bに側鎖Aが結合したグラフト共重合体等の様式が挙げられる。もちろん、1つの分子中に、ブロック共重合体とグラフト共重合体とが共存していてもよい。

40

(共重合体(A)の製造方法)

曇点を有する高分子と親水性高分子とのブロック共重合体は、例えば予め両者に反応活性な官能基(水酸基、カルボキシル基、アミノ基、イソシアネート基等)を複数導入し、両者を化学反応により結合させることによって得ることができる。

【0042】

一般に、グラフト共重合体の合成法としては、1)重合体の連鎖移動反応を利用する方法、2)幹重合体に遊離基に分裂し得る官能基を導入し、そこから重合を開始する方法、

50

3) 幹重合体からイオン重合を開始させる方法等が知られている。本発明のグラフト共重合体をこれらの方法によって得ることもできるが、側鎖の重合度を制御するという観点からは、曇点を有する高分子鎖中に1個の重合性官能基を導入し、親水性高分子を与える単量体と共重合させるか；あるいは親水性高分子鎖中に1個の重合性官能基を導入し、曇点を有する高分子を与える単量体と共重合させて得ることが有利である。これらの重合性官能基は、必要に応じて、曇点を有する高分子鎖中、および／又は親水性高分子鎖中に2以上導入してもよい。

(熱可逆ハイドロゲル形成性組成物)

本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物は、前記ハイドロゲル形成性の高分子(A)と曇点を有する高分子(B)を少なくとも含むが、本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物の水溶液または水分散液が「昇温時ゲル化タイプ」の熱可逆ゾル-ゲル転移を示す限り、ハイドロゲル形成性の高分子(A)と曇点を有する高分子(B)の量比は特に制限されない。この(A)と(B)の量比を変えることにより、本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物の水溶液または分散液がハイドロゲル状態を呈する時の相分離構造を制御することができる。

10

【0043】

本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物におけるハイドロゲル形成性高分子(A)の含有量は、(高分子(A)と高分子(B)との合計量を基準として)20質量%~95質量%の範囲(より好ましくは40~80質量%の範囲)であることが好ましい。高分子(A)の含有量が20質量%未満では、本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物の水溶液または水分散液がハイドロゲル状態を維持することが困難となる傾向が生じ易い。他方、高分子(A)の含有量が95質量%を越えると、曇点を有する高分子(B)に対するハイドロゲル形成性高分子(A)の量比が大きくなり過ぎ、ハイドロゲル相分離構造の形成が不十分となる傾向が生じやすい。

20

【0044】

本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物における曇点を有する高分子(B)の含有量は、(高分子(A)と高分子(B)との合計量を基準として)5質量%~80質量%の範囲(より好ましくは20~60質量%の範囲)であることが好ましい。この高分子(B)の含有量が5質量%未満では、本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物の水溶液または水分散液がハイドロゲル状態となった際に、十分な相分離構造を形成することが困難となる傾向が生じ易くなる。他方、高分子(B)の含有量が80質量%を越えると、ハイドロゲル形成性高分子(A)に対する曇点を有する高分子(B)の量比が大きくなり過ぎ、ハイドロゲルが離水現象(シネレシス)を起こし易くなる。

30

(熱可逆ハイドロゲル形成性組成物の相分離)

本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物は、ハイドロゲル形成性高分子(A)のゾル-ゲル転移温度(T_g 、℃)および曇点を有する高分子(B)の曇点(T_c 、℃)よりも低い低温領域では、ハイドロゲル形成性高分子(A)および曇点を有する高分子(B)ともに親水性で水に溶解するため、完全に水に溶解して透明な均一水溶液となる。

【0045】

また、本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物を構成するハイドロゲル形成性高分子(A)のゾル-ゲル転移温度より曇点を有する高分子(B)の曇点が高い場合($T_g < T_c$)は、該低温の均一水溶液の温度を徐々に昇温する際に、ハイドロゲル形成性高分子(A)の相がゲル化する現象が先行し、次いで曇点を有する高分子(B)の相分離が起こる。更に、本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物を構成するハイドロゲル形成性高分子(A)のゾル-ゲル転移温度より曇点を有する高分子(B)の曇点が高い場合($T_g < T_c$)は、該低温の均一水溶液の温度を徐々に昇温する際に、曇点を有する高分子(B)の相分離が先行し、次いでハイドロゲル形成性高分子(A)の相がゲル化する現象が起こる。

40

【0046】

本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物では、上記 T_g と T_c を制御することにより

50

その水溶液がハイドロゲルを形成する際の相分離構造を任意に制御することができる。本発明者らの知見によれば、 T_a と T_b の差（すなわち $|T_a - T_b|$ の値）が小さいほど相分離構造の大きさが小さくなる。ハイドロゲルの相分離構造を小さくすることが望ましい場合には、 T_a と T_b の差を 5°C 以下、更には 3°C 以下にすることが好ましい。

【0047】

一方、本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物が形成するハイドロゲルの相分離構造を大きくすることが望ましい場合には、 T_a と T_b の差を大きくすることが好ましく、 T_a と T_b の差を 3°C 以上、更には 7°C 以上とすることが好ましい。しかしながら、 $T_a < T_b$ の場合、 T_a と T_b の差（ $|T_a - T_b|$ の値）を大きくするためには T_a を低くする必要があり、低温水溶液状態の温度範囲が狭くなる。また、 $T_b < T_a$ の場合、 T_a と T_b の差を大きくするためには T_a を高く設定する必要があり、ハイドロゲル状態の温度範囲が狭くなると同時にハイドロゲルの強度が低くなるという問題を生じる傾向がある。従って、 T_a と T_b の差は 3°C 以上、 25°C 以下の範囲であることが好ましい。

10

【0048】

必要に応じて、 T_a と T_b の差を実質的にゼロとしてもよい。この場合には、水溶液のゲル化と、相分離が同時に起こるという現象が生じることとなる。

（相分離構造の確認）

本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物の水溶液または水分散液が形成するハイドロゲルの相分離構造は濁度の測定によって確認することができる。ハイドロゲル状態で相分離を起こすと濁度の上昇が認められる。ハイドロゲルの濁度は観測波長 500 nm における吸光度を測定することによって得られる。

20

【0049】

より具体的には本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物の水溶液を光路長 1 cm のガラス製セルに入れ、 5°C 以下に冷却して均一な水溶液とした後、徐々に（例えば、 $1^{\circ}\text{C}/$ 分程度の昇温速度で）温度を上げ、ゲル化温度以上でその濁度を測定する。濁度を測定する温度は、ハイドロゲル形成性高分子（A）のゾルーゲル転移温度（ $T_g^{\circ}\text{C}$ ）および曇点を有する高分子（B）の曇点（ $T_b^{\circ}\text{C}$ ）よりも高い温度 $T_d^{\circ}\text{C}$ （例えば 37°C ）であることが望ましい。上記したハイドロゲル形成性高分子（A）のゾルーゲル転移温度（ $T_g^{\circ}\text{C}$ ）および曇点を有する高分子（B）の曇点（ $T_b^{\circ}\text{C}$ ）よりも高い温度 $T_d^{\circ}\text{C}$ は、 T_a と T_b のうち高い方の温度（ T_H ）より 5°C 以上高い温度であることが好ましく、更には、 T_H より 10°C 以上高い温度であることが好ましい。

30

【0050】

本発明ではハイドロゲルを使用する温度（ $T^{\circ}\text{C}$ ）における 500 nm の吸光度として、 $0.2 \sim 2$ の範囲が好ましく、 $0.4 \sim 1.8$ の範囲がより好ましい。該吸光度がこの 0.2 未満であるとハイドロゲルの相分離構造の形成が不十分となる傾向が生じやすくなる。他方、吸光度が 2 を越えるとハイドロゲルの相分離構造が大きくなり過ぎる傾向が生じやすくなる。本発明においては、この 500 nm における吸光度を、相分離構造の大きさの指標とすることができる。

【0051】

この濁度（吸光度）の測定に際しては、下記の測定条件が好適に使用可能である。

40

【0052】

＜濁度（吸光度）の測定条件＞

測定機器：商品名＝U2001形日立ダブルビーム分光光度計および131-0040温度表示付恒温セルホルダ、（株）日立製作所製、

試料溶液（ないし分散液）の濃度（ただし「熱可逆ハイドロゲル形成性組成物」の濃度として）： 10 （重量）％、

試料溶液の量：約 3.5 g 、

測定用セルの形状・寸法：ガラス製セル $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 。

【0053】

測定波長 500 nm 。

50

【0054】

操作：恒温セルホルダの設定温度をハイドロゲル形成性高分子（A）のゾルーゲル転移温度（ T_g 、℃）および曇点を有する高分子（B）の曇点（ T_b 、℃）よりも高い温度 T ℃（例えば37℃）に設定し、ガラス製セルに入れた試料を4℃に冷却した後、恒温セルホルダにセットする。分光光度計の波長を500nmに固定したまま、吸光度を経時的に記録する。試料温度が一定となり、吸光度の変化がほとんど認められなくなった時点（例えば30分後）の吸光度を測定する。

（実質的に水不溶）

本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物の水溶液または水分散液は、ハイドロゲル形成性高分子（A）のゾルーゲル転移温度（ T_g 、℃）および曇点を有する高分子（B）の曇点（ T_b 、℃）よりも高い（すなわち、 T_H より高い）高温領域では、実質的に水不溶性のハイドロゲル状態となるが、該ゲル化の後に、多量の水中に浸漬しても、該ゲルは実質的に溶解しない。上記ハイドロゲルのこのような特性は、例えば、以下のようにして確認することが可能である。

【0055】

すなわち、本発明のハイドロゲル形成性組成物0.15gを、上記ハイドロゲル形成性高分子（A）のゾルーゲル転移温度（ T_g 、℃）および曇点を有する高分子（B）の曇点（ T_b 、℃）よりも低い温度（例えば氷冷下）で、蒸留水1.35gに溶解して10質量%の水溶液を作製し、該水溶液を径が35mmのプラスチックシャーレ中に注入し、ハイドロゲル形成性高分子（A）のゾルーゲル転移温度（ T_g 、℃）および曇点を有する高分子（B）の曇点（ T_b 、℃）よりも高い温度 T ℃（例えば37℃）に加温することによって、厚さ約1.5mmのゲルを該シャーレ中に形成させた後、該ゲルを含むシャーレ全体の重量（ f グラム）を測定する。

【0056】

次いで、該ゲルを含むシャーレ全体を250ml中の水中に上記温度 T ℃で10時間静置した後、該ゲルを含むシャーレ全体の重量（ g グラム）を測定して、ゲル表面からの該ゲルの溶解の有無を評価する。この際、本発明のハイドロゲル形成性組成物においては、上記ゲルの重量減少率、すなわち $(f - g) / f$ が、5.0%以下であることが好ましく、更には1.0%以下（特に0.1%以下）であることが好ましい。

【0057】

本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物の水溶液は、上記ハイドロゲル形成性高分子（A）のゾルーゲル転移温度（ T_g 、℃）および曇点を有する高分子（B）の曇点（ T_b 、℃）よりも高い温度（ T ℃）でゲル化させた後、該温度 T ℃で多量（体積比で、ゲルの0.1～100倍程度）の水中に浸漬しても、長期間（例えば、3ヶ月間程度）に亘って該ゲルは溶解することがない。

【0058】

上記したハイドロゲル形成性高分子（A）のゾルーゲル転移温度（ T_g 、℃）および曇点を有する高分子（B）の曇点（ T_b 、℃）よりも高い温度 T ℃は、 T_g と T_b のうち高い方の温度（ T_H ）より5℃以上高い温度であることが好ましく、更には、 T_H より10℃以上高い温度であることが好ましい。

（生理活性物質）

生理活性物質とは、生物の営む精妙な生命現象に、微量で関与し影響を与える有機物質、無機イオンを総称する。本発明においては、ハイドロゲルから溶出し難い点からは、分子量が1,000以上、更には3,000以上（特に5,000以上）の生理活性物質が好適に使用可能である。該生理活性物質は、単一分子、または重合体のいずれであってもよい。必要に応じて、2種以上の生理活性物質を用いてもよいが、このような態様においては、該2種以上の生理活性物質のうち、少なくとも1種の分子量が1,000以上であることが好ましい。

【0059】

本発明に使用可能な生理活性物質の一態様たる生体高分子の具体例としては、例えば、

10

20

30

40

50

コラーゲン、ゼラチン、アルブミン、グロブリン、フィブリノーゲン、インスリン、グルカゴン、ラミニン、フィブロネクチン、エンタクチン、ナイドジェン、テネイシン、トロポスポンジン、オステオネクチン、フィブリン、ビトロネクチン、エラスチン等のタンパク質やペプチド類、デンプン、グリコーゲン、ヒアルロン酸、セルロール、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸等の多糖類やグリコサミノグリカン、パーシカン、アグリカン、パールカン、アグリリン、デコリン、ビグリカン、セルグリシン、シンデカン等のプロテオグリカン、RNA、DNA等の核酸が挙げられる。

(生理活性物質の含有方法)

上記の生理活性物質を、熱可逆ハイドロゲル形成性組成物に含有させる方法は、特に制限されない。

10

【0060】

このような含有手法の最も簡便なものとしては、生理活性物質の水溶液または水分散液を、熱可逆ハイドロゲル形成性組成物の水溶液とそのゾルーゲル転移温度より低い温度で混合する方法が挙げられる。該混合の後、混合系の温度をゾルーゲル転移温度より高い温度に昇温することにより、ハイドロゲル形成性高分子が疎水相互作用によって形成する3次元網目構造中に生理活性物質が取り込まれ保持される。ここで、生理活性物質の分子量が1,000未満の場合、一旦網目構造中に保持された生理活性物質が上記3次元網目構造を容易にすり抜けて拡散してしまう傾向が強まり、ハイドロゲルが生理活性を長期間維持し難くなる。

【0061】

他方、上記した生理活性物質が分子量の大きい高分子である場合には、該生理活性物質の水溶液相と、ハイドロゲル形成性高分子の水溶液相が相分離を起こし易くなり、両者を均一に混合することの困難性が高くなりやすい。

20

【0062】

本発明者らは、鋭意研究の結果、生理活性物質をハイドロゲル形成性高分子(A)あるいは曇点を有する高分子(B)に結合させることが、該生理活性物質を熱可逆ハイドロゲル形成性組成物に含有させる点から、極めて効果的な方法であることを見出した。

【0063】

このように生理活性物質をハイドロゲル形成性高分子(A)あるいは曇点を有する高分子(B)に結合させる方法によれば、低分子量の生理活性物質であってもハイドロゲルからの拡散、溶出といった問題を防止できる。しかしながらこの場合、低分子量の生理活性物質はハイドロゲル形成性高分子に結合させることによって、その生理活性が損なわれることも起こり得る。このような点からも、本発明で用いる生理活性物質の分子量は1,000以上であることが好ましい。この理由は、生理活性物質が高分子である場合、その一部の官能基がハイドロゲル形成性高分子との結合に使用されても、生理活性を発現する部位がその活性を維持したまま残存する可能性が高くなるためと推定される。

30

【0064】

生理活性物質とハイドロゲル形成性高分子(A)あるいは曇点を有する高分子(B)の結合方法としては、共有結合による結合が最も強固であるので望ましい。他方、生理活性物質が高分子電解質である場合には、ハイドロゲル形成性高分子(A)あるいは曇点を有する高分子(B)に反対符号の電荷を導入し、静電的な相互作用を介する高分子間コンプレックスとして結合させても良い。例えば、生理活性物質がヘパリンのようなポリアニオンである場合、ハイドロゲル形成性高分子(A)中の曇点を有する高分子ブロック(C)または親水性高分子ブロック(D)をポリカチオンとしておくことで、ポリイオンコンプレックスを形成させることもできる。

40

【0065】

生理活性物質をハイドロゲル形成性高分子(A)あるいは曇点を有する高分子(B)に共有結合させる方法としては、例えば、生理活性物質中の官能基と結合反応しうる反応活性な官能基を、ハイドロゲル形成性高分子(A)あるいは曇点を有する高分子(B)中に導入し、両者を結合反応させる方法がある。また、生理活性物質中に重合性官能基(例え

50

ばアクリロイル基)を導入しておき、ハイドロゲル形成性高分子(A)あるいは曇点を有する高分子(B)を与える単量体と共重合させても良い。更には、生理活性物質とハイドロゲル形成性高分子(A)あるいは曇点を有する高分子(B)の混合物(望ましくは混合水溶液)に放射線を照射して、両分子間に架橋構造を導入することもできる。

【0066】

本発明で使用する生理活性物質に細胞接着因子としてコラーゲンやゼラチンを用いることは有用であるが、ゼラチンの水溶液は低温でゲル化する性質があり、本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物の水溶液または水分散液が低温で流動性のある水溶液状態となることの妨げとなる場合がある。この場合、コラーゲンやゼラチンを酵素等により分解した低分子量のコラーゲンペプチドあるいは水溶性ゼラチンを用いることが好ましい。コラーゲンやゼラチンの分子量が大きいと低温でゲル化する傾向が強くなるため、本発明で用いるコラーゲンやゼラチンの分子量は3万以下、好ましくは1万以下、より好ましくは5000以下である。

【0067】

本発明で使用する生理活性物質に、細胞接着因子として知られている合成ペプチドを使用することもできる。すなわち、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン、トロンボスポンジン、テネイシン、オステオネクチン等の細胞外マトリックス分子が細胞接着関連の基本構造として分子内に有するアミノ酸配列を合成、再構成したものである。具体的にはRGD(Ar g - G l y - A s p、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸)やRGDS(Ar g - G l y - A s p - S e r、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-セリン)、Y I G S R、P D G S R、R Y V V L P R、R N A E I I K D A、R E D V、L R G D N、L R E、I K V A V、E I L D V、I D A P S等が知られている。これらの合成ペプチドをハイドロゲル形成性高分子(A)あるいは曇点を有する高分子(B)に結合する場合は、合成ペプチドの分子量が1,000以下であってもその生理活性を損なわずに本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物として機能する。

(生理活性物質の含有量)

生理活性物質の含有量(ないし導入率)は、ハイドロゲルが生理活性機能を発現でき、熱可逆的なゾル-ゲル転移挙動が損なわれない範囲であれば特に制限はない。通常、生理活性を充分発揮できハイドロゲルの物性に重大な影響を及ぼさない範囲として、含有される生理活性物質の重量をE、熱可逆ハイドロゲル形成性組成物の重量をFとした場合、生理活性物質の重量Eは、該生理活性物質を含めたハイドロゲル形成性組成物全体(E+F)との比 $E/(E+F)$ で0.1~70質量%、更には0.5~30質量%(特に1~20質量%)の範囲であることが好ましい。

(生理活性物質の保持性)

本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物の水溶液または水分散液は、ハイドロゲル形成性高分子(A)のゾル-ゲル転移温度(T_g 、℃)および曇点を有する高分子(B)の曇点(T_c 、℃)よりも高い高温領域では、実質的に水不溶性のハイドロゲル状態となるが、この水不溶性のハイドロゲル状態において、該ゲルの前記生理活性物質の初期含有量を(G)とし、該ゲルを大過剰の水中に浸漬した後の該生理活性物質の含有量を(H)とした際に、これら含有量の比(H/G)が80%以上であることが好ましい。生理活性をより長期間維持するという点からは、この含有量の比(H/G)は、90%以上、更には95%以上であることが好ましい。

【0068】

上記初期含有量(G)および浸漬後の含有量(H)は、以下の方法で好適に測定可能である。

【0069】

<生理活性物質含有量の測定方法>

初期含有量(G)の生理活性物質を含有する熱可逆ハイドロゲル形成性組成物1.5gを4℃でゾル状態とし、直径35mmのプラスチック製シャーレ中に注入し、ハイドロゲル形成性高分子(A)のゾル-ゲル転移温度(T_g 、℃)および曇点を有する高分子(B)

の曇点 (T_b , °C) よりも高い温度でゲル化させ、該 T_a と T_b のうち高い方の温度 (T_H) より 5 °C 高い温度の蒸留水 250 ml に該ゲルを含むシャーレを浸漬する。そのまま該 T_a と T_b のうち高い方の温度 (T_H) より 5 °C 高い温度で 1 時間静置した後、水中から上記ゲルを含むシャーレを取り出し、余剰の水分を除去した後、該ゲル中の該生理活性物質の含有量 (H) を測定する。

【0070】

上記の生理活性物質含有量は、該生理活性物質の生理活性を生物学的あるいは生化学的手法（例えば、細胞増殖機能、細胞分化機能、酵素活性等）により定量しても良いし、物理化学的あるいは分光学的な手法（例えば、元素分析、IR、NMR、紫外可視吸光分析、液体クロマトグラフィー等）を用いて適宜、定量することができる。このような生物学的、生化学的、物理化学的ないしは分光学的な手法の詳細に関しては、文献（例えば、実験生物学講座、1～17巻、1982年～1985年、丸善（株））を参照することができる。

10

【0071】

以下に実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は以下の実施例によって限定されるものではない。

【実施例】

【0072】

実施例 1

N-イソプロピルアクリルアミド（（株）興人）108.5 g 及び n-ブチルメタクリレート（和光純薬）4.26 g をエタノール 600 g に溶解し、蒸留水 400 g を加え、窒素気流下 37 °C で 10 質量% 過硫酸アンモニウム（APS）水溶液 10 mL 及び N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン（TEMED）1 mL を加え、窒素気流下 37 °C に保持したまま 5 時間反応させた。

20

【0073】

反応液を 4 °C の蒸留水 30 L で希釈し、該水溶液を 4 °C で分画分子量 10 万の限外濾過膜（バイオマックス 100、P2B100V20、ミリポア社製）を用いて 3 L まで濃縮した。濃縮液に蒸留水 30 L を加えて希釈、再度 4 °C で 3 L まで限外濾過濃縮を行った。この希釈、濃縮操作を更に 4 回（合計 5 回）繰り返し、未反応物及び低分子量物を除去した。

30

【0074】

得られた最終濃縮液を凍結乾燥して、曇点を有する高分子 (I) 84 g を得た。得られた高分子 1 g を生理食塩水 99 g に 4 °C で溶解して透明な 1 質量% 水溶液を調製した。該水溶液の温度を徐々に上げて行くと 20 °C で白濁した。37 °C まで昇温すると白濁は更に強くなった。該白濁水溶液を 4 °C に冷却すると再び透明な水溶液に戻った。

実施例 2

酸処理豚皮由来コラーゲン酵素分解物（コラーゲンペプチド SCP-5100、分子量 5,000、新田ゼラチン（株）製）24 g を蒸留水 96 g に 37 °C で溶解し、N-アクリロイルスクシンイミド（国産化学（株））3.26 g を加えて 37 °C で 4 日間反応させることにより、コラーゲンペプチドに重合性基を導入してなる重合性コラーゲンペプチドの水溶液を得た。

40

【0075】

N-イソプロピルアクリルアミド（（株）興人）108.5 g 及び n-ブチルメタクリレート（和光純薬）4.26 g をエタノール 600 g に溶解し、上記の重合性コラーゲンペプチドの水溶液 123.3 g および蒸留水 400 g を加え、窒素気流下 37 °C で 10 質量% 過硫酸アンモニウム（APS）水溶液 10 mL 及び N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン（TEMED）1 mL を加え、窒素気流下 37 °C に保持したまま 5 時間反応させた。

【0076】

反応液を 4 °C の蒸留水 30 L で希釈し、該水溶液を 4 °C で分画分子量 10 万の限外濾過

50

膜（バイオマックス100、P2B100V20、ミリポア社製）を用いて3Lまで濃縮した。濃縮液に蒸留水30Lを加えて希釈、再度4℃で3Lまで限外濾過濃縮を行った。この希釈、濃縮操作を更に4回（合計5回）繰り返し、未反応物及び低分子量物を除去した。

【0077】

得られた最終濃縮液を凍結乾燥して、コラーゲンペプチドを結合した曇点を有する高分子（II）105gを得た。得られた高分子1gを生理食塩水99gに4℃で溶解して透明な1質量%水溶液を調製した。該水溶液の温度を徐々に上げて行くと20℃で白濁した。37℃まで昇温すると白濁は更に強くなった。該白濁水溶液を4℃に冷却すると再び透明な水溶液に戻った。

実施例3

N-イソプロピルアクリルアミド（（株）興人）602g及びn-ブチルメタクリレート（和光純薬）37.1gをエタノール9470gに溶解し、ポリエチレングリコールジメタクリレート（PDE-6000、日本油脂（株））192.9gを蒸留水1093gに溶解した水溶液および蒸留水5466gを加え、窒素気流下70℃で10質量%過硫酸アンモニウム（APS）水溶液68mL及びN, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン（TEMED）6.8mLを加え、窒素気流下70℃に保持したまま30分間反応させた。窒素気流下70℃に保持したまま上記APS水溶液68mLとTEMED6.8mLを加える操作を30ごとに4回繰り返した。

【0078】

反応液を4℃の蒸留水30Lで希釈し、該水溶液を4℃で分画分子量10万の限外濾過膜（バイオマックス100、P2B100V20、ミリポア社製）を用いて10Lまで濃縮した。濃縮液に蒸留水35Lを加えて希釈、再度4℃で10Lまで限外濾過濃縮を行った。この希釈、濃縮操作を更に8回（合計9回）繰り返し、未反応物及び低分子量物を除去した。

【0079】

得られた最終濃縮液を凍結乾燥して、ハイドロゲル形成性高分子（III）496gを得た。得られたハイドロゲル形成性高分子1.0gに蒸留水を加えて全体を10gとし、冷却下（4℃）で溶解して濃度10質量%の均一水溶液とした。この水溶液を加温すると体温でハイドロゲルとなり、動的粘弾性の測定によりゾル-ゲル転移温度を求めると、昇温時および降温時ともに20℃であった。該水溶液は0℃以上15℃より低い温度では常に液状であって、ゲル化することはなかった。該混合水溶液の37℃における500nmの吸光度（濁度）は0.092であった。

実施例4

N-イソプロピルアクリルアミド（（株）興人）426g及びn-ブチルメタクリレート（和光純薬）34.3gをエタノール5924gに溶解し、ポリエチレングリコールジメタクリレート（PDE-6000、日本油脂（株））115gを蒸留水651gに溶解した水溶液および蒸留水3716gを加え、窒素気流下70℃で10質量%過硫酸アンモニウム（APS）水溶液40mL及びN, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン（TEMED）4mLを加え、窒素気流下70℃に保持したまま30分間反応させた。窒素気流下70℃に保持したまま上記APS水溶液40mLとTEMED4mLを加える操作を30ごとに4回繰り返した。

【0080】

反応液を4℃の蒸留水30Lで希釈し、該水溶液を4℃で分画分子量10万の限外濾過膜（バイオマックス100、P2B100V20、ミリポア社製）を用いて5Lまで濃縮した。濃縮液に蒸留水35Lを加えて希釈、再度4℃で5Lまで限外濾過濃縮を行った。この希釈、濃縮操作を更に5回（合計6回）繰り返し、未反応物及び低分子量物を除去した。

【0081】

得られた最終濃縮液を凍結乾燥して、ハイドロゲル形成性高分子（V）278gを得た

10

20

30

40

50

。得られたハイドロゲル形成性高分子 1.0 g に蒸留水を加えて全体を 10 g とし、冷却下 (4℃) で溶解して濃度 10 質量% の均一水溶液とした。この水溶液を加温すると体温でハイドロゲルとなり、動的粘弾性の測定によりゾル-ゲル転移温度を求めると、昇温時および降温時ともに 15℃ であった。該水溶液は 0℃ 以上 10℃ より低い温度では常に液状であって、ゲル化することはなかった。該混合水溶液の 37℃ における 500 nm の吸光度 (濁度) は 0.088 であった。

実施例 5

N-イソプロピルアクリルアミド ((株)興人) 443 g 及び n-ブチルメタクリレート (和光純薬) 17.2 g をエタノール 5924 g に溶解し、ポリエチレングリコールジメタクリレート (PDE-6000、日本油脂 (株)) 115 g を蒸留水 651 g に溶解した水溶液および蒸留水 3298 g を加え、窒素気流下 70℃ で 10 質量% 過硫酸アンモニウム (APS) 水溶液 40 mL 及び N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) 4 mL を加え、窒素気流下 70℃ に保持したまま 30 分間反応させた。窒素気流下 70℃ に保持したまま上記 APS 水溶液 40 mL と TEMED 4 mL を加える操作を 30 ごとに 4 回繰り返した。

10

【0082】

反応液を 4℃ の蒸留水 30 L で希釈し、該水溶液を 4℃ で分画分子量 10 万の限外濾過膜 (バイオマックス 100、P2B100V20、ミリポア社製) を用いて 5 L まで濃縮した。濃縮液に蒸留水 35 L を加えて希釈、再度 4℃ で 5 L まで限外濾過濃縮を行った。この希釈、濃縮操作を更に 5 回 (合計 6 回) 繰り返し、未反応物及び低分子量物を除去した。

20

【0083】

得られた最終濃縮液を凍結乾燥して、ハイドロゲル形成性高分子 (IV) 286 g を得た。得られたハイドロゲル形成性高分子 1.0 g に蒸留水を加えて全体を 10 g とし、冷却下 (4℃) で溶解して濃度 10 質量% の均一水溶液とした。この水溶液を加温すると体温でハイドロゲルとなり、前述したようなレオメータを用いた動的粘弾性の測定によりゾル-ゲル転移温度を求めると、昇温時および降温時ともに 26℃ であった。該水溶液は 0℃ 以上 20℃ より低い温度では常に液状であって、ゲル化することはなかった。該混合水溶液の 37℃ における 500 nm の吸光度 (濁度) は 0.12 であった。

実施例 6

30

酸処理豚皮由来コラーゲン酵素分解物 (コラーゲンペプチド SCP-5100, 分子量 5,000、新田ゼラチン (株) 製) 48 g を蒸留水 96 g に 37℃ で溶解し、N-アクリロイルスクシンイミド (国産化学 (株)) 6.5 g を加えて 37℃ で 4 日間反応させることにより、コラーゲンペプチドに重合性基を導入してなる重合性コラーゲンペプチドの水溶液を得た。

【0084】

N-イソプロピルアクリルアミド ((株)興人) 355 g 及び n-ブチルメタクリレート (和光純薬) 21.9 g をエタノール 4750 g に溶解し、ポリエチレングリコールジメタクリレート (PDE-6000、日本油脂 (株)) 75.4 g を蒸留水 678 g に溶解した水溶液、上記の重合性コラーゲンペプチドの水溶液および蒸留水 2400 g を加え、窒素気流下 70℃ で 10 質量% 過硫酸アンモニウム (APS) 水溶液 40 mL 及び N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) 4 mL を加え、窒素気流下 70℃ に保持したまま 30 分間反応させた。窒素気流下 70℃ に保持したまま上記 APS 水溶液 40 mL と TEMED 4 mL を加える操作を 30 ごとに 4 回繰り返した。

40

【0085】

反応液を 4℃ の蒸留水 30 L で希釈し、該水溶液を 4℃ で分画分子量 10 万の限外濾過膜 (バイオマックス 100、P2B100V20、ミリポア社製) を用いて 5 L まで濃縮した。濃縮液に蒸留水 35 L を加えて希釈、再度 4℃ で 5 L まで限外濾過濃縮を行った。この希釈、濃縮操作を更に 5 回 (合計 6 回) 繰り返し、未反応物及び低分子量物を除去した。

50

【0086】

得られた最終濃縮液を凍結乾燥して、コラーゲンペプチドを結合したハイドロゲル形成性高分子 (V I) 238 g を得た。得られたコラーゲンペプチド結合ハイドロゲル形成性高分子 1.0 g に蒸留水を加えて全体を 10 g とし、冷却下 (4℃) で溶解して濃度 10 質量% の均一水溶液とした。この水溶液を加温すると体温でハイドロゲルとなり、動的粘弾性の測定によりゾル-ゲル転移温度を求めると、昇温時および降温時ともに 20℃ であった。該水溶液は 0℃ 以上 15℃ より低い温度では常に液状であって、ゲル化することはなかった。該混合水溶液の 37℃ における 500 nm の吸光度 (濁度) は 0.098 であった。

実施例 7

実施例 2 で得られたコラーゲンペプチドを結合した曇点を有する高分子 (I I) 10 g を蒸留水 90 g に溶解して 10 質量% の曇点高分子 (I I) 水溶液とした。実施例 3 で得られたハイドロゲル形成性高分子 (I I I) 10 g を蒸留水 90 g に溶解して 10 質量% のハイドロゲル高分子 (I I I) 水溶液とした。10 質量% の曇点高分子 (I I) 水溶液 10 g と 10 質量% のハイドロゲル高分子 (I I I) 水溶液 10 g を 4℃ で均一に混合した。該混合水溶液を加温すると体温でハイドロゲルとなり、動的粘弾性の測定によりゾル-ゲル転移温度を求めると、昇温時および降温時ともに 20℃ であった。また該混合水溶液の 37℃ における 500 nm の吸光度 (濁度) は 1.12 であった。

【0087】

該混合液 10 g を底面積 25 cm² ポリスチレン製細胞培養用フラスコ (コーニング社製、No. 430168) に入れて凍結乾燥した。凍結乾燥後、フラスコごと 150 mm 幅の滅菌袋 (メディックロール、三興化学工業(株)製) に入れヒートシールした。滅菌袋に入れたフラスコをエチレンオキサイドガス滅菌器 (Eogelk, SA-1000, (株)イキ製) を使用して 95% 酸化エチレン 50 g (エキテック 95、液化炭酸(株)製) により、40℃ でエチレンオキサイドガス (EOG) 滅菌し、更に 40℃ で 96 時間エアレーション処理した。

【0088】

上記により得られた曇点高分子 (I I) とハイドロゲル高分子 (I I I) 1:1 (重量比) から成る本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物 (V I I) 1 g の滅菌物をフラスコにいたまま、5% FBS (子牛胎児血清) 含有 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培地 10 mL を無菌的に加え、4℃ で溶解させた。この水溶液に MDCK (Madin-Darby canine kidney、犬尿細管細胞) 細胞を 5×10^3 個/mL となるように懸濁させ、その 500 μ L を 37℃ に暖めた 6 ウェルプレート (6 ウェル中央に 1 ウェル) に乗せて島状にゲル化させた。そのゲルの上に 37℃ に暖めた 5% FBS 含有 DMEM 培地 4 mL を重層して 5% CO₂ 雰囲気下 37℃ で 2 日間培養後、重層培地を除去して新たに 37℃ に暖めた 5% FBS 含有 DMEM 培地 4 mL を重層し、HGF (肝幹細胞増殖因子) を最終濃度が 55 pM となるように添加した。そのまま 5% CO₂ 雰囲気下 37℃ で 3 日間培養後、上記の培地交換と HGF 添加を行い、更に 4 日間 5% CO₂ 雰囲気下 37℃ で培養を続けた。上記のようにして 9 日間培養後、位相差顕微鏡でゲル内の細胞の様子を観察した。細胞は増殖し、スフェロイドを形成するとともに尿細管様の太いひも状の形態形成が認められた (図 1)。

【0089】

HGF を添加しなかった以外は上記と同様の手順で 9 日間培養を行った場合には、細胞は増殖してスフェロイドを形成するが、ひも状の形態形成は認められなかった (図 2)。

実施例 8

10 質量% の曇点高分子 (I I) 水溶液 5 g と 10 質量% のハイドロゲル高分子 (I I I) 水溶液 10 g を 4℃ で均一に混合した。該混合水溶液を加温すると体温でハイドロゲルとなり、動的粘弾性の測定によりゾル-ゲル転移温度を求めると、昇温時および降温時ともに 20℃ であった。また該混合水溶液の 37℃ における 500 nm の吸光度 (濁度) は 0.513 であった。

10

20

30

40

50

【0090】

該混合水溶液10gを実施例7と同様にして凍結乾燥および滅菌処理し、曇点高分子（II）とハイドロゲル高分子（III）0.5：1（重量比）から成る本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物（VII）1gのEOG滅菌物を得た。実施例7と同様にして5%FBS含有DMEM培地に溶解し、MDCK細胞のHGF添加培養実験を9日間行った結果、細胞は増殖し、スフェロイドを形成するとともに尿細管様の細いひも状の形態形成が認められた（図3）。

【0091】

HGFを添加しなかった以外は上記と同様の手順で9日間培養を行った場合には、細胞は増殖してスフェロイドを形成するが、ひも状の形態形成は認められず、細胞増殖も実施例7に比べると少なかった（図4）。

実施例9

10質量%の曇点高分子（II）水溶液2gと10質量%のハイドロゲル高分子（II）水溶液10gを4℃で均一に混合した。該混合水溶液を加温すると体温でハイドロゲルとなり、動的粘弾性の測定によりゾルーゲル転移温度を求めると、昇温時および降温時ともに20℃であった。また該混合水溶液の37℃における500nmの吸光度（濁度）は0.231であった。該混合水溶液10gを実施例7と同様にして凍結乾燥および滅菌処理し、曇点高分子（II）とハイドロゲル高分子（II）0.2：1（重量比）から成る本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物（IX）1gのEOG滅菌物を得た。実施例7と同様にして5%FBS含有DMEM培地に溶解し、MDCK細胞のHGF添加培養実験を9日間行った結果、細胞は増殖し、スフェロイドを形成するとともに尿細管様の細いひも状の形態形成がわずかに認められた（図5）。またHGFを添加せずに上記の9日間培養を行った場合でも細胞は増殖してスフェロイドを形成するが、ひも状の形態形成は認められず、細胞増殖も実施例8に比べると少なかった（図6）。

実施例10

実施例2で得られたコラーゲンペプチドを結合した曇点を有する高分子（II）10gを蒸留水90gに溶解して10質量%の曇点高分子（II）水溶液とした。実施例4で得られたハイドロゲル形成性高分子（IV）10gを蒸留水90gに溶解して10質量%のハイドロゲル高分子（IV）水溶液とした。10質量%の曇点高分子（II）水溶液5gと10質量%のハイドロゲル高分子（IV）水溶液10gを4℃で均一に混合した。該混合水溶液を加温すると体温でハイドロゲルとなり、動的粘弾性の測定によりゾルーゲル転移温度を求めると、昇温時および降温時ともに12℃であった。また該混合水溶液の37℃における500nmの吸光度（濁度）は0.954であった。

【0092】

該混合水溶液10gを実施例7と同様にして凍結乾燥および滅菌処理し、曇点高分子（II）とハイドロゲル高分子（IV）0.5：1（重量比）から成る本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物（X）1gのEOG滅菌物を得た。実施例7と同様にして5%FBS含有DMEM培地に溶解し、MDCK細胞のHGF添加培養実験を9日間行った結果、細胞は著しく増殖し、スフェロイドを形成したが尿細管様の細いひも状の形態形成は認められなかった（図7）。

【0093】

HGFを添加しなかった以外は上記と同様の手順で9日間培養を行った場合には、細胞は実施例8以上に増殖してスフェロイドを形成した（図8）。

実施例11

実施例2で得られたコラーゲンペプチドを結合した曇点を有する高分子（II）10gを蒸留水90gに溶解して10質量%の曇点高分子（II）水溶液とした。実施例5で得られたハイドロゲル形成性高分子（V）10gを蒸留水90gに溶解して10質量%のハイドロゲル高分子（V）水溶液とした。10質量%の曇点高分子（II）水溶液5gと10質量%のハイドロゲル高分子（V）水溶液10gを4℃で均一に混合した。該混合水溶液を加温すると体温でハイドロゲルとなり、動的粘弾性の測定によりゾルーゲル転移温度

を求めると、昇温時および降温時ともに23℃であった。また該混合水溶液の37℃における500nmの吸光度(濁度)は1.40であった。

【0094】

該混合水溶液10gを実施例7と同様にして凍結乾燥および滅菌処理し、曇点高分子(II)とハイドロゲル高分子(V)0.5:1(重量比)から成る本発明の熱可逆ハイドロゲル形成性組成物(XI)1gのEOG滅菌物を得た。実施例7と同様にして5%FBS含有DMEM培地に溶解し、MDCK細胞のHGF添加培養実験を9日間行った結果、細胞は増殖し、スフェロイドを形成するとともに尿細管様の細いひも状の形態形成が認められ、ひもの太さは実施例8を上回った(図9)。

【0095】

HGFを添加しなかった以外は上記と同様の手順で9日間培養を行った場合でも、細胞は増殖してスフェロイドを形成した(図10)。

比較例1

実施例3で得られたハイドロゲル形成性高分子(III)(すなわち、高分子(A))10gを蒸留水90gに溶解して10質量%のハイドロゲル高分子(III)水溶液とした。該混合水溶液10gを実施例7と同様にして凍結乾燥および滅菌処理し、ハイドロゲル高分子(III)1gのEOG滅菌物を得た。実施例7と同様にして5%FBS含有DMEM培地に溶解し、MDCK細胞のHGF添加培養実験を9日間行った結果、細胞は殆ど増殖しなかった。HGFを添加しなかった以外は上記と同様の手順で9日間培養を行った場合には、細胞の増殖が全く認められなかった(図11)。

比較例2

実施例6で得られたハイドロゲル形成性高分子(VI)(すなわち、高分子(A))10gを蒸留水90gに溶解して10質量%のハイドロゲル高分子(VI)水溶液とした。該混合水溶液10gを実施例7と同様にして凍結乾燥および滅菌処理し、ハイドロゲル高分子(VI)1gのEOG滅菌物を得た。実施例7と同様にして5%FBS含有DMEM培地に溶解し、MDCK細胞のHGF添加培養実験を9日間行った結果、細胞はほとんど増殖しなかった。HGFを添加しなかった以外は上記と同様の手順で9日間培養を行った場合には、細胞の増殖が全く認められなかった。

【図面の簡単な説明】

【0096】

【図1】実施例7において得られた光学顕微鏡写真(倍率:80倍)である。尿細管様の太いひも状の形態形成が認められる。

【図2】実施例7においてHGFを添加しない場合に得られた光学顕微鏡写真(倍率:80倍)である。尿細管様の太いひも状の形態形成が認められない。

【図3】実施例8において得られた光学顕微鏡写真(倍率:80倍)である。尿細管様の太いひも状の形態形成が認められる。

【図4】実施例8においてHGFを添加しない場合に得られた光学顕微鏡写真(倍率:80倍)である。尿細管様の太いひも状の形態形成が認められない。

【図5】実施例9において得られた光学顕微鏡写真(倍率:80倍)である。尿細管様の太いひも状の形態形成が認められる。

【図6】実施例9においてHGFを添加しない場合に得られた光学顕微鏡写真(倍率:80倍)である。尿細管様の太いひも状の形態形成が認められない。

【図7】実施例10において得られた光学顕微鏡写真(倍率:80倍)である。スフェロイドの形成が認められる。

【図8】実施例10においてHGFを添加しない場合に得られた光学顕微鏡写真(倍率:80倍)である。スフェロイドの形成が認められる。

【図9】実施例11において得られた光学顕微鏡写真(倍率:80倍)である。尿細管様の太いひも状の形態形成が認められる。

【図10】実施例11においてHGFを添加しない場合に得られた光学顕微鏡写真(倍率:80倍)である。スフェロイドの形成が認められる。

10

20

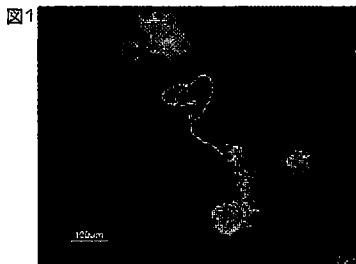
30

40

50

【図 1 1】 比較例 1 において H G F を添加しない場合に得られた光学顕微鏡写真（倍率：80 倍）である。細胞の増殖が全く認められない。

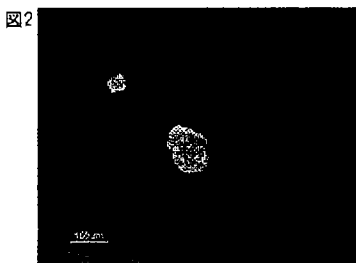
【図 1】



【図 3】



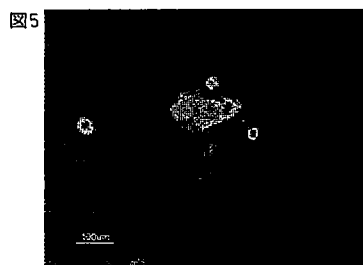
【図 2】



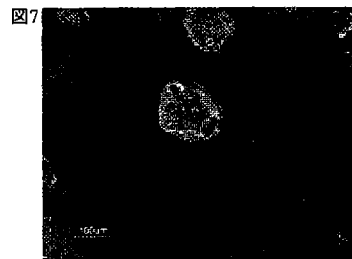
【図 4】



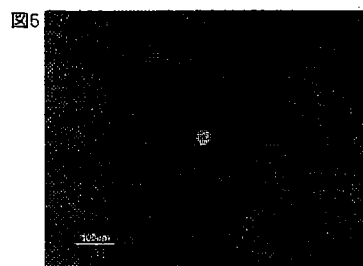
【図 5】



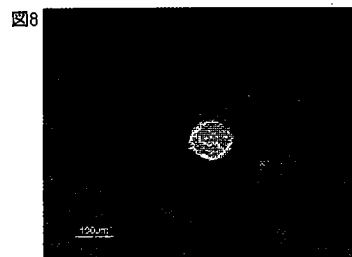
【図 7】



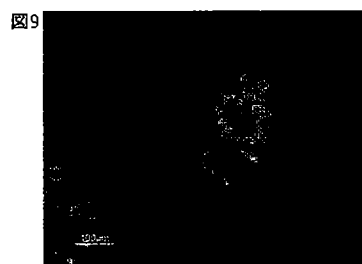
【図 6】



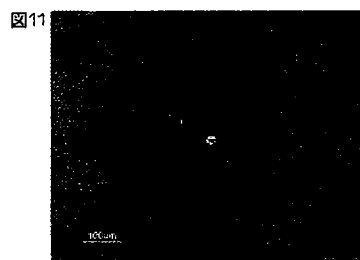
【図 8】



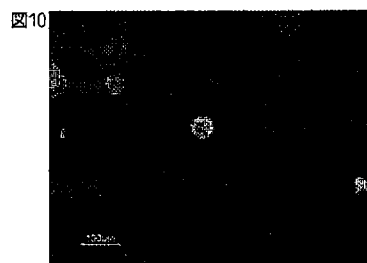
【図 9】



【図 1 1】



【図 1 0】



フロントページの続き

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 吉岡 浩

神奈川県秦野市下落合 1 1 - 1

(72)発明者 森 有一

神奈川県横浜市金沢区釜利谷南 3 - 2 1 - 2 - 4

(72)発明者 三浦 茂樹

埼玉県所沢市こぶし町 1 - 4

(72)発明者 菱川 慶一

神奈川県横浜市青葉区あかね台 2 - 2 1 - 1 5

F ターム(参考) 4C081 AA02 AA12 AC04 BB07 CE02 DA12

4J002 AB03W AB05W BC10W BE02W BE02X BE04W BE04X BG01W BG07W BG13W

BG13X BJ00W BQ00W CH02W CH02X

4J031 AA03 AA15 AA16 AA20 AA22 AA25 AA26 AA53 AC03 AC07

AC08 AD01 AF03 AF09